

凍結融解並びに骨温変動が冷凍保存骨の組織学的 所見におよぼす影響*

(冷凍保存同種骨移植に関する研究 III)

内 海 壽 彦

札幌医科大学整形外科教室 (主任 河邨教授)

Influences of Changes in Temperature, Especially Thawing on the Histological Findings of Refrigerated Bones (Studies on Refrigerated Homologous Bone Grafts III)

By

TOSHIHIKO UTSUMI

Department of Orthopedic Surgery, Sapporo University of Medicine
(Chief: Prof. B. KAWAMURA)

骨は冷却ないし冷凍によつて如何なる変化を受けるかについては、すでに多くの研究がなされているが、さて冷凍状態の骨を室温下にもたらす時凍結融解に伴なつてひき起される変化については殆ど記載されていない。ところが保存骨移植の實際上、この問題はなかなか重要である。即ち如何に優秀な冷却及び冷凍保存を行つても、その融解に意を拂わずば急速に起る骨の壊死その他によつてせつかくの保存骨が台無しになつてしまうであらう。

また冷凍室の恒温調節器の故障や、研究員の室内出入などによつてなん等かの温度変動を余儀なくせられた保存骨が如何なる変化を受けるかも、その後の有効保存期間に影響を與える点で見逃しえないところである。

かかる実際の使用上重要な問題を解明すべく次の実験を行つた。

実験方法

実験材料：健康家兎肋骨及び人間の胸廓形成術に際してえられる肋骨。

実験要領：I-a)群 -25°Cにて空気を冷媒として冷凍保存2週目に至り、更にこれを3群に分ち、1群は30分、2群は60分、3群は120分間32°Cに放置した後、再び-25°C冷凍保存し、1, 4, 8週後に取出して10%ホルマリンにて固定。

I-b)群 同上冷凍2週目のものを32°Cに放置10, 30, 120分後、再冷凍することなく直ちに10%ホルマリンにて固定。

II-a)群 -80°Cドライアイスエーテルにて冷却数分後-25°Cの空気を媒質とする環境に保存2週目に至りI-a)群と同じ要領で固定。

II-b)群 同上冷凍保存2週のものにつきI-b)群と同様の固定。

III-a)群 クエン酸ソーダ家兎血漿中に浸け+5°C冷蔵保存2週目のものにつきI-a)と同様の標本を得る。

III-b)群 同上冷蔵保存のものにつきI-b)群と同様の標本を得る。

IV群 人間の肋骨にてI-a)群と同様の標本をうる。

V群 -25°C2週冷凍保存の人間肋骨を10, 30, 60, 120分、32°C放置後それぞれ10%ホルマリン固定。

以上の8群の標本につき硝酸ホルマリン脱灰、型の如き脱水を経てセルロイジン切片を得、これにヘマトキシリン・エオジン染色及びヴァンギーソン染色を施し鏡検した。

* 本研究費の一部は昭和26, 27年度北海道科学研究助成金(代表河邨教授)によつた。

なお本論文要旨は昭和28年11月7日北海道医学会第31回大会において発表した。

組織所見

A) 家兎肋骨

1) -25°C 空氣冷凍保存 2 週後 32°C 放置群

a) 30 分放置後再保存 1 週：骨細胞の核染色はわりに良く保たれているが核濃縮様の変化を示すところあり、骨髓の核染色は良く保たれているが、それは肋骨の両端部から深部の骨梁に閉ざされた髓腔に見られる所見で断端に近い所はやはり核濃縮を示すものが多い。四圍の筋組織は死後変化としての横紋の消失、筋線維のちぢれが軽度に見られる。

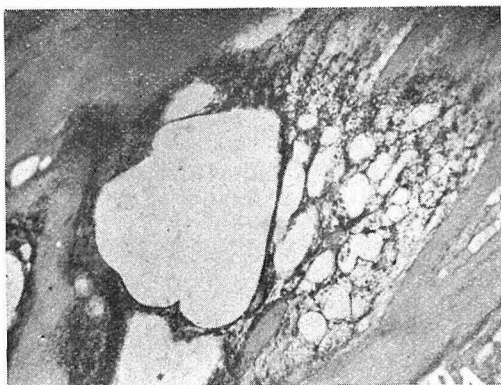
b) 同上 4 週：上述の傾向は更に強まり、とくに筋組織・骨皮質ともに表在部に変化が著しい。

c) 同上 8 週：前 2 者と大差ないが上述の傾向が更にやや強まり骨細胞は核壁過染様の変化及び核崩壊様の変化が著明となり、骨髓は外界と交通を有する部分に核濃縮様所見が所によつて強い。

d) 120 分放置後再保存 1 週：筋表在部に横紋消失、核変化、蠟様変性様変化等の死後変化が認められるほか、骨細胞は核崩壊、核分解様変化を来し、核壁過染様変化もある。骨髓細胞の核染色はわりに良く保たれているが、これも核濃縮様変化が一般に認められる。

e) 同上 4 週：以上の変化は更にやや著明である。

f) 同上 8 週：以上の変化は更に著明でとくに表在部及び外界と直接交通を有する部に変化が著明である(第 1 図)。



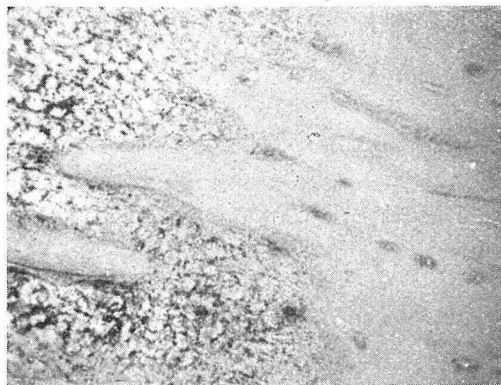
第 1 図 -25°C 冷凍保存 2 週後 32°C 放置 120 分に至り再保存後 8 週

g) 60 分放置後再保存 1 週：a) と d) の中間的所見を呈す。

h) 同上 4 週及び 8 週もそれぞれ b) と e), c) と f) の中間的所見を呈す。

i) 放置 10, 30, 120 分の所見：いずれも筋表層の死後変化は上述 1~8 週再保存のものに比し軽く、骨細胞の核

染色はわりに良く保たれ、核濃縮、核崩壊、核壁過染を軽く示すものがあるが、量的、質的に再保存のものより少い。骨髓もこれと似た所見である。このような変化は放置時間の長くなるに従いその度を増し、次第に深部に波及する(第 2 図)。



第 2 図 -25°C 冷凍保存 2 週後 32°C 放置 120 分のもの

2) -80°C ドライアイスエーテル冷却数分後 -25°C 保存 2 週にして 32°C 放置群

a) 30 分放置後再保存 1 週：骨細胞の核染色は比較的良く保たれているが、核濃縮、核壁過染、核崩壊、核分解様変化を示すものあり、これらは骨膜に近い外界と交通を有する部に多い。骨髓は比較的良く保たれているほか、筋組織は横紋消失等の死後変化を主にその表在部に示す。

b) 同上 4 及び 8 週：再保存期間が進むほど軽度ながら上述の変化の程度が強まる。

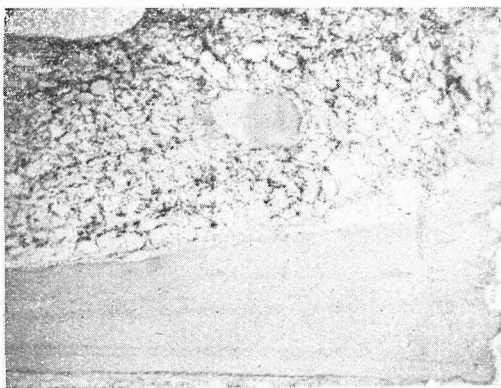
c) 120 分放置後再保存 1 週：同上の諸変化は前 3 者より著明でハーヴェルス氏小管内その他の深在性のものにもこの変化が波及している。骨髓、筋の変化もより廣範な部に見られる。

d) 同上 4 及び 8 週：更に上述の変化はやや強まっている(第 3 図)。

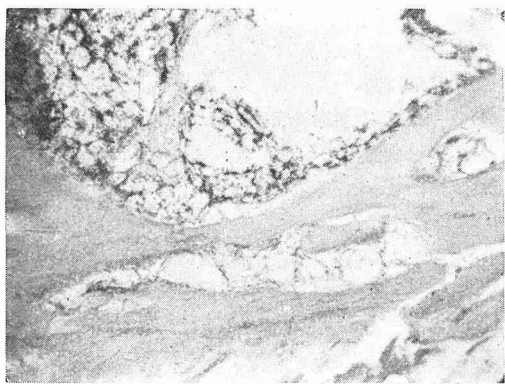
e) 60 分放置後再保存各期のものは上述のものの中間的所見を呈す。

f) 放置 10, 30, 120 分の所見：10 分のものでは骨細胞の核染色はわりに良く保たれ表在性のものおよび外界と交通ある部にいくらか上述の変化がみられる。骨髓、筋組織もわりに良く核染色が保たれている。これは 30 分になると核濃縮-崩壊-壁過染様変化がやや目立つようになり、とくに表在部及び外界と直接交通ある部に著しい。120 分に至ると骨細胞の核染色低下及び上述の核変化は一層著明になる(第 4 図)。

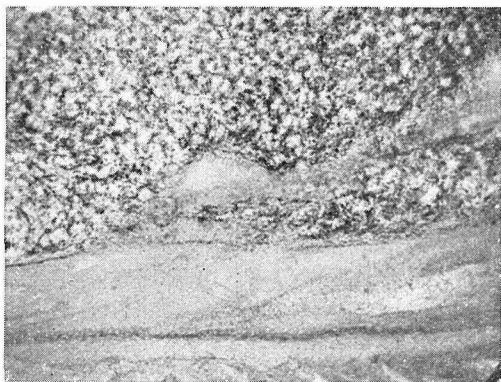
3) $+5^{\circ}\text{C}$ 血漿中冷蔵保存 2 週後 32°C 放置群



第3図 -80°C 冷凍保存2週後 32°C 放置
120 分に至り再保存8週



第5図 +5°C 冷蔵保存2週後 32°C 放置
120 分に至り再保存8週



第4図 -80°C 冷凍保存2週後 32°C 放置
120 分のもの

a) 30 分放置後再保存1週：骨細胞の核染色性は比較的良く保たれているが、表在性及び外界と直接交通ある部の核濃縮-崩壊-壁過染様変化が軽度に見られる。骨髓にも表在性の部に核濃縮様変化がみられる。筋組織も死後変化としての横紋消失、ちぢれ、核変化、蠟様変性様変化が表在部に認められる。

b) 同上4週：核崩壊、濃縮等の変化が前者よりいくらか強い。

c) 同上8週：以上の変化が核壁過染を含めて更にかなり強い。この変化の量的質的進行度は冷凍保存のものに比し数段早いようである。

d) 120 分放置後再保存1週：骨細胞の染色性はわりに良いが核変性が深在性の細胞にまで及び、骨髓、筋組織にもかなり強い上述の諸変化を認める。ことに後者では蠟様変性が著明である。

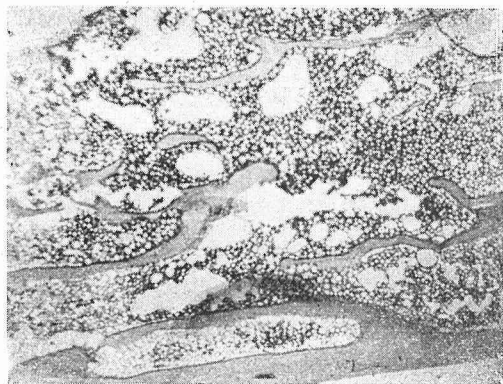
e) 同上4及び8週：以上の変化は量的質的にますます進み極めて深在部にまで波及している(第5図)。

f) 60 分放置後再保存各期：前2者の中間的所見を呈す。

g) 放置10, 30, 120 分の所見：10 分では骨細胞の染色性はわりに良く保たれているが核変化はかなり深部におよんで表在性のものより著明、骨髓、筋組織も同様である。30, 120 分と進むにつれてその程度を増し後者では相当強い変化を来している(第6図)。



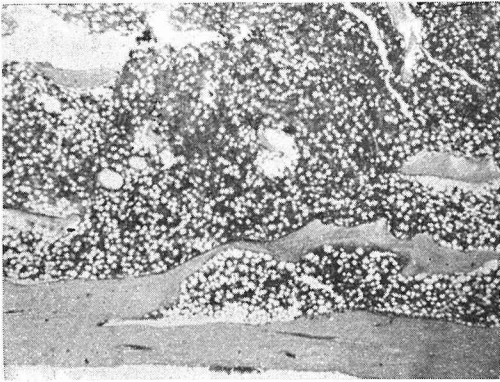
第6図 +5°C 冷蔵保存2週後 32°C 放置
120 分のもの



第7図 -25°C 冷凍保存2週後 32°C 放置
120 分に至り、再保存8週後

B) 人間肋骨

これについては、32°C 放置と -25°C 2 週保存後 32°C 30, 60, 120 分放置後再保存 1, 4, 8 週にこの所見のみ求めたが、家兎肋骨と大同小異の所見であつた(第 7, 8 図)。



第 8 図 -25°C 冷凍保存 2 週後 32°C 放置
120 分のもの

総括並びに考按

以上の所見を総括する。先ず冷凍保存骨を常温曝露後これを再冷凍した時生ずる変化についてであるが、30分程度の曝露のものならば再冷凍保存 1, 4, 8 週のもの間に殆ど差異がなく、ただ長期のもの程変性過程がいくらか進んでいるのが認められる程度である。しかし常温曝露時間が 60, 120 分のものになると、再冷凍期間の長いものほど変化は著しくなってくる。つまり一般的にいつて、常温曝露時間の長いものほど、再冷凍保存期間においても変化の進行が速かであるということである。かくて保存中の常温曝露は好ましからざる影響を保存骨に與えることが知られたのである。

次に常温曝露後冷蔵再保存したものについてであるが、室温曝露 30 分のものにおいて、再冷蔵保存 1 週では冷凍保存のものに比べても遜色ないが、4 週に至ると細胞の変性漸く顯著となり、8 週のものでは冷凍保存のものに比べて明かに高度の変化を示す。この変性への傾向は、常温曝露が長いものほど著しく、かつ再保存期間の長くなるにつれて急速に進行するが、冷凍保存骨に比べその速度はかなり遅い。常温曝露 10 分のものでは著

しくないが、30 分ではすでに変性や、目立ち 120 分では顯著である。

冷凍骨はその性質上、使用に際して必然的に凍結融解の過程を通る。この融解なる現象は凍結の反対現象であるため、凍結速度に影響する因子はこの際も同様に影響すると考えられる。

物理化学的見地からは、凍結速度が大なればなるほど、物質中の微粒子は凍結状態においても元のゾルまたはゲルの状態と同様の関係を保つていて、もしこのような条件で冷凍した場合には融解速度の遅速に関係なしに元のゾルまたはゲルに復帰するとされている。もし凍結が緩徐に行われ比較的大なる氷結晶が組織内に出来た時は、融解は急速に行つても元の状態に復帰しないで、融解速度に関係なく氷結晶は水となり、分散相を形成していた微粒子が沈澱するであろうことが想定される。¹⁾

凍結温度の過度の降下は可逆性を失わしめる。肉類については Plank²⁾の研究によると完全な可逆性は望み得べくもないが最大約 80% の範囲内でこれを期待しうる限界温度がある筈で、これに可及的早く達するように冷却すべきであるといひ、Heiss³⁾はこれとやや異なつた意見即ち -193°C 以内では低温なるほど可逆性は次第に増すといつてゐるが未だ確かな結論は得られていない。

凍結時間即ち貯藏時間の長いほど可逆性が減少する事実も認められているが、凍結により組織内の氷結晶形成とともに組織細胞内の水分含量の変動及び流動性を保持する部分の濃度の変化(濃縮)をきたし、これが蛋白質等の主要成分の変性をきたすものとされ、筋肉蛋白質ではこのために次第に凝固して行く一種の変性が認められている。かつ融解に際し氷結晶の部が融けて流れ去るものであれば、ここに変性は動かないものとなる理で、この辺の問題が可逆性と重要な関連を有しているとされている。

融解の條件中変化し得るものは、凍結物の周囲にある融解媒及びその温度である。一般に融解が速に行うには水を、緩慢に融解せしめるには空

1) 谷川・秋場：冷蔵の科学(中) 127~255(昭26)。

2) Plank: Z. ges. Kaelte.-Ind. 39, (4) (1932)。

3) Heiss: Biochem. Z. 267; Z. ges. Kaelte.-Ind. 40, (7) Ice & Cold Storage. Nov. (1933)。

氣が用いられているが、この際の骨温の変動の態様は別の論文(第1篇)に明かであるからここでは説明を省く。融解法には3通り考えられ、i) 温水中での融解では水中・空気中でのそれより極めて早く融解が済むが、水溶性諸成分の脱出、また逆に水分の吸収等が起る。ii) 氷水中での融解は低温での融解であるため長時間を要するが、微生物の発育に悪条件という有利な点があるし、また自家消化等の変化も或る程度阻止出来る。iii) 空気による緩慢な融解では、成分の脱出少なく、注意して行えば前2者より優秀な結果を得られるとされている。

融解速度は食品の場合、諸種の見解があるがあまり長時間かかつて(10数時間以上)融解する時は微生物の発育、自家消化等により鮮度、重量の低下が危惧されるのであるが、形の小さなもの一般は、特別の融解操作の必要はないとされている。即ち室温にて調理中に適度な状態に融解するというのである。

骨については——私の実験の範囲内では、液体媒質を用いての検討を欠いていてこれとの比較は今出来ないが——空気を媒質とした32°Cにての融解はせいぜい30分までは細胞の状態は良好な状態に保たれていることは確められたが故に、われわれは移植の實際に際してこのことを念頭に入れて用うる必要があり、移植約30分前に手術室に持ち來しそのまま自然融解せしめるのを可とし保存中の骨温變動は可及的避けるを要することもまた明かである。

-20°Cないし-25°C保存の肋骨は常温に曝すと15分以内に凍結状態からすでに解放されているものであることは第1篇で述べた。

以上は主として物理化学的見地からする先人の知見に基づいて考察したのであるが、この種の検索は、本邦では昭和25年に岩佐氏⁴⁾の詳細な研究がある。彼によると-50°Cの迅速冷凍は-3°Cまた-10°Cの緩速冷凍より細胞に悪影響があつたようであり、-3°C~-10°C~-50°Cの24時間間隔の緩速階段冷凍(仮称)及び融解の方が迅速冷凍及び融解に勝るといふ結果を得ているが、私の

実験からも在來の学説からも同氏の説には承服出来ぬ点がある。

緩速冷凍では、細胞組織内の水分の氷結晶は数は少ないが大なるものの形成を見、これは細胞組織に大いなる破壊作用を及ぼすものとされるに反し、迅速冷凍は氷結晶の数はそれに比し多く出来るが形が小さく破壊作用はそれだけ少ないというのが定説である。岩佐氏の実験結果はこの定説と全く相反するもので氏の-50°C冷凍が最も劣つていているという結論には、にわかに賛成し得ぬものがあるが、これは後日の追試に委ねたい。また融解は緩速の方が失われる水分少なく従つて細胞内の諸成分濃度への影響が少ないため良いとされているが、-50°Cの骨を3日もかかつて融解することは非實際的であり、融解に際しての骨温の環境温への順應の態様からすれば温空気を媒質としての自然融解にまかせて可なるものである。

結 論

1) 私は冷凍骨と冷蔵骨について、その常温曝露の及ぼす組織学的影響を調べた。

2) 冷凍骨を融解すると時間が経つに従い、細胞組織の変性が次第に進むが-20°C~-25°Cの空気冷媒にて冷凍したもの-80°Cのドライアイスエーテルにて冷凍したもの間には著明な差はない。常温曝露後再保存したものは、その保存期間長期にわたると極めて軽微ながら変性を認めるようになる。かつ長時間曝露した後再保存したものの短期と長期の間の変化の差は短時間曝露して再保存したもののそれより大である。

3) 冷蔵骨は曝露時間の長くなるに従い著明な変性をとげ、その程度は冷凍骨より著明である。再保存してからもこの変性進行はかなり迅速で冷凍骨のいずれのものより再保存短期と長期の間の変化の差は大であつた。

4) 組織学的検索の結果よりすれば、臨床的に冷凍保存骨移植を行うに当つては、骨片を温空気の媒質、即ち手術室にもたらし、少なくとも30分前後に移植を終了するを可とするものと推定される。

4) 岩佐：日整会誌 25, 172 (昭25)。

5) 保存中の常温曝露は当然ながら極力避けなければならない。即ち同一容器には骨片1個を原則とすべきで、何個も入れておき手術室の温度に

さらして後、余つたものを再び冷凍室に戻すが如きことがあつてはならない。

(昭和28.10.12受付)

Summary

Regardless of the quality of refrigerating machines, if we are careless in keeping the temperature of the medium constant or unless the time of thawing is controlled, the refrigerated bones might degenerate and be rendered useless.

The author has conducted a study on histological influences of artificial temperature changes and thawing on the following bones;

A-group: Bones, refrigerated and preserved at -25°C in an atomospheric medium.

B-group: Bones, preserved at -25°C after cooled at -80°C in dry-ice-ether.

C-group: Bones, cooled and preserved at $+5^{\circ}\text{C}$.

These bones, after preserved 2 weeks, were exposed to room temperature (at 32°C) respectively 30, 60 and 120 minutes. Then they were returned to their respective temperatures and preserved once more. After 1, 4, or 8 weeks they were examined histologically, with the following results,

1) The longer the time after thawing, the more remarkable the degeneration of each specimen. But the difference between A- and B-groups were almost negligible.

2) Degeneration was caused by re-preserving for long term after exposing in room temperature. And the longer the exposing or re-preserving, the more remarkable the degenerative phenomena.

3) The above processes in C-group are far more remarkable than the other.

4) Bone grafts refrigerated at -25°C should be brought into the operating room out of the refrigerator just about 30 minutes before actual transplanting. Only in these condition the grafts can be utilized safely. A long exposure to room temperature must be strictly avoided.

(Received Oct. 12, 1953)